

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

14. 6. 2004

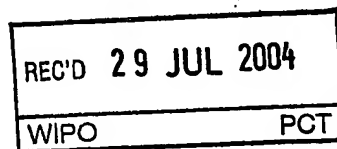
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月12日

出願番号
Application Number: 特願2003-167744
[ST. 10/C]: [JP 2003-167744]

出願人
Applicant(s): エーザイ株式会社

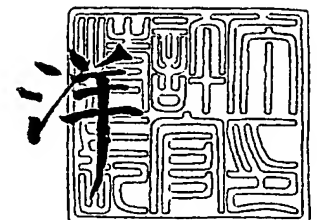


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【提出日】 平成15年 6月12日

【整理番号】 03EPSD0201

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00
A61P 9/10
A61P 25/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 9 - 7 - 4 0 1

【氏名】 赤祖父 盛

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市根戸 3 8 5 - 9 9

【氏名】 木村 真奈美

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004983

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経細胞保護剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 塩酸ドネペジルを含有する神経細胞保護剤。

【請求項 2】 塩酸ドネペジルを含有する、脳虚血又は興奮性毒性によって誘発される神経細胞傷害の予防・治療剤。

【請求項 3】 塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴う脳虚血又は興奮性毒性によって誘発される神経細胞傷害の予防・治療剤。

【請求項 4】 塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は塩酸ドネペジルを含有する神経細胞保護剤に関する。

【0002】


【従来の技術】

塩酸ドネペジルは、アセチルコリンを分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼを可逆的に阻害することにより脳内のアセチルコリンの量を増加させ、脳内コリン作動性神経系を賦活する物質であり、アルツハイマー型老年性痴呆、アルツハイマー病の治療薬として広く用いられており（特許文献 1 参照）、塩酸ドネペジルに関して様々な研究機関で研究されている。Jin Zhouらは、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤がラット PC12 細胞（腫瘍細胞）の虚血様細胞傷害に対して保護的な効果があるという旨の論文を発表しており、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の一例として塩酸ドネペジルを用いている（非特許文献 1 参照）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

前記文献で用いられている PC12 細胞とは、褐色細胞腫であり、好クロム性



細胞腫ともいい、副腎髄質あるいは交感神経節細胞などクロム親和性細胞から発生するカテコールアミン産生腫瘍である。そのため、PC12細胞は脳神経細胞ではなく、細胞間にシナプスを形成しておらず、また興奮性物質に反応する機能も有していないことが知られている（非特許文献2参照）。よって、前記文献では、癌化した細胞についての検討がなされているのみであり、新たに脳神経細胞より調製された初代培養神経細胞を用いた検討は一切なされていない。従って、塩酸ドネペジルが、実際の神経細胞における虚血様傷害に対する保護効果を証明するデータは未だに知られていなかった。

【0004】

【特許文献1】

特許第2576475号公報

【非特許文献1】

Zhou, J., Fu, Y., Tang, X. C., 2001. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 306, 53-56)。

【非特許文献2】

Sucher, N. J, 1993. Expression of Endogenous NMDAR1 Transcripts without Receptor Protein Suggests Post-transcriptional Control in PC12 Cells. *The journal of Biological Chemistry.* Vol. 268, No. 30, 22299-22304.

【0005】

【課題を解決するための手段】

そこで、本願発明の発明者らは鋭意検討した結果、意外にも塩酸ドネペジルが神経細胞を保護する作用を有するということを発見した。発明の目的は、神経細胞を保護する薬剤を提供することにある。

【0006】

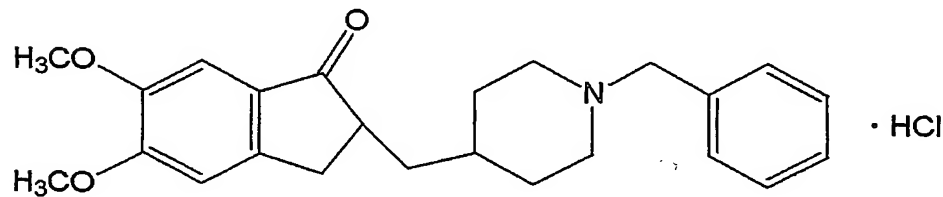
即ち、本願発明は（1）塩酸ドネペジルを含有する神経細胞保護剤、（2）塩酸ドネペジルを含有する、脳虚血又は興奮性毒性によって誘発される神経細胞傷害の予防・治療剤、（3）塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴う脳虚血又は興奮性毒性によって誘発される神経細胞傷害の

予防・治療剤、(4) 塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善剤、に関する。

【0007】

塩酸ドネペジル (正式名: (±)-2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-5,6-dimethoxy-indan-1-one monohydrochloride) は、下記の化学式で表わされる物質である。

【化1】



【0008】

本願において、神経細胞保護とは、神経細胞に対する虚血様作用によるもの、NMDA (N-methyl-D-aspartate)、カイニン酸など興奮性物質による興奮性毒性によるもの、NO (nitric oxide) や活性酸素種によるものの他、様々の負荷に対する作用をいい、例えば、神経細胞に対する負荷による神経細胞死を実際に防止する作用のほか、神経細胞の機能低下を防止する作用を含む広い意味に用いる。また、脳虚血により誘発される神経細胞傷害とは、例えば脳梗塞、脳卒中、脳塞栓（最近ではアルツハイマーの原因とも言われている）などの脳神経の変性疾患等の傷害をいう。

【0009】

【発明の実施の形態】

本願発明に係る神経細胞保護剤が、虚血性の傷害から神経細胞を保護する効果については、OGD (Oxygen Glucose Deprivation : 酸素グルコース除去) 試験によって評価した。また、本願発明に係る神経細胞保護剤が、興奮性毒性から神経細胞を保護する効果については、NMDA またはカイニン酸刺激試験によって評価

した。

【0010】

(OGD試験)

本試験では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して酸素・グルコース除去による負荷を与えることによって虚血様細胞傷害を誘発するというモデルを用いた。塩酸ドネペジルが前記虚血様傷害に対して神経細胞保護作用を有するかどうかの検討を行なった。

【0011】

本試験においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生17-19日齢）の大脳皮質より得た。細胞は37°C、5% CO₂環境下で培養した。7日以上培養した後、OGD処理を施こした。OGD処理は、ラット初代培養大脳皮質神経細胞をグルコースの入っていない緩衝液中に置き、それから密閉されたチャンバーに移し、窒素置換を行ない低酸素環境にすることによって行なった。OGD処理後の細胞は、グルコースの入っていない緩衝液から細胞培養用溶液に置換し、37°C、5% CO₂環境下で一晩培養した。まず、OGD処理の前後でドネペジルを添加することによって神経細胞保護の効果が認められるのか、また、変化するのかを検討した。OGD処理の12時間前からドネペジルを添加したPre-12h、OGD処理の1時間前からドネペジルを添加したPre-1h及びOGD処理の1時間後からドネペジルを添加したPost-1hと、OGD処理をしなかったCont及びOGD処理前後にドネペジルを加えなかったVehicleとの神経細胞保護作用を比較した。神経保護作用の指標としては、LDHの放出の抑制率を用いた。LDH (lactate dehydrogenase) は細胞質に存在する酸化還元酵素であり、ピルビン酸を乳酸へと変換し、それに伴って存在しているNADH (nicotinamide adenine dinucleotide) 量を減少させる。したがって、細胞がOGDにより傷害を受けるとLDHが細胞内から細胞外の溶液中に流出し、その溶液には細胞の傷害度（細胞死）に応じてLDHが存在することになる。また、溶液中に存在するLDHの量はその溶液にピルビン酸、および、NADHを加え、NADHの減少率を吸光度計により測定することによって分る。結果を図1に示す。図1から明らかなようにPre-12hが最も大きなLDH放出抑制作用を示し、以下Pre-1h、Post-1hと続いた。この

結果により、OGD処理の12時間前からドネペジルを添加した場合に、神経細胞を効果的に保護するということが分かる。これ以降のOGD試験におけるドネペジルの添加時間はいずれもPre-12hに固定した。

【0012】

次に、先ほどの試験と同様の操作によりラット初代培養細胞をOGD処理した際の神経細胞を顕微鏡により観察した。結果を図2に示す。図2から明らかなように、Vehicle (B) ではコントロール (A) と比較して細胞が正常な状態をとどめておらず、OGDによってダメージを受けていることがよく分かる。一方、OGD処理の前にドネペジルを添加した場合には、(B) に見られるような神経細胞のダメージは見られず、OGD処理前の神経細胞の状態に近い状態であることが明らかである (C)。よって、OGD処理前にドネペジルを添加することにより、神経細胞が保護されているということが分る。

【0013】

次に、前述の試験と同様の操作により、ラット初代培養神経細胞をOGD処理し、その際に各種アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ガランタミン、タクリン、リバスチグミン) 及びドネペジルを用いてそれぞれの濃度を変えて細胞に添加した際のLDH放出に及ぼす影響について試験を行なった。添加した濃度は、ドネペジル、タクリン及びリバスチグミンは0.1, 1.0, 10 μ M、ガランタミンは1.0, 10, 100 μ Mとした。結果を図3に示す。図3Aより明らかなように、ドネペジルのみが用量依存的に神経細胞のLDH放出を統計上有意に抑制していることが分かる。ここで、それぞれのラット脳破碎懸濁液におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の50%阻害濃度 (IC₅₀) を表1に示す。

【表 1】

AChE 阻害	I C ₅₀ (nM)
ドネペジル*	6.7±0.35
ガラントミン#	1200±33
タクリン*	77±1.4
リバスチグミン*	4.3±0.087

#:未発表社内データ、*:Ogura et al. 2000. Comparison of inhibitory activities of Donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 22, 609-613 による。

表1から明らかなように、ドネペジルのアセチルコリンエステラーゼ50%阻害濃度はリバスチグミンとほぼ同等であることが分かる。しかしながら、リバスチグミンや他のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は神経細胞保護作用を示さなかった。この結果は、神経保護作用がアセチルコリンエステラーゼ阻害作用とは異なる作用機序に基づくものであることを示唆している。

【0014】

次に、ドネペジルの神経細胞保護作用が、アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミン（ムスカリン受容体アンタゴニスト）及びメカミラミン（ニコチン受容体アンタゴニスト）を細胞に添加した際にどのように影響を受けるのかを以下の実験により調べた。

前述の試験と同様に、OGD処理の12時間前からドネペジル、スコポラミン、メカミラミン、ドネペジルとスコポラミン、もしくは、ドネペジルとメカミラミンを神経細胞培養液中に添加し、OGD処理によるLDH放出に及ぼす影響について試験を行なった。添加した濃度は、ドネペジル、スコポラミン、メカミラミンのいずれも10 μ Mとした。

【0015】

本試験の結果を図4に示す。図4より明らかなように、ドネペジルの神経細胞保護作用は、Cont（OGD処理なし）、Vehi（ドネペジル添加なし）及びドネペジル添加のいずれのサンプルにおいてもアセチルコリン受容体アンタゴニストで

あるスコポラミン又はメカミラミンの添加の有無によっては影響を受けていないということが分かる。これは、アセチルコリン受容体の阻害の有無に関係なく神経細胞を保護しているということを示す。よって、本実験によりドネペジルはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用以外の作用機序によって神経細胞保護的に作用していると考えられる。

【0016】

(興奮性毒性試験)

本試験では、グルタミン酸レセプターの一つに分類されるNMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプターに対する作用を検討した。ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対してNMDA刺激を与えることによって細胞傷害を誘発するというモデルを用いた。前述のようにして得られたラット初代培養神経細胞に対してNMDA 100 μ Mを添加し、9時間後に培養液中に存在するLDHの量を測定した。

【0017】

本試験においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生17-19日齢）の大脳皮質より得た。細胞は37°C、5%CO₂環境下で培養した。7日以上培養した後、培地にNMDA 100 μ Mを加え、37°C、5%CO₂環境下で一晩培養した。ドネペジルはNMDA刺激を加える12時間前から細胞に添加した。そして、NMDA添加9時間後に培養液中に存在するLDHの量を測定し神経保護作用の指標とした。

【0018】

本試験の結果を図5に示す。図5より、ドネペジルが0.1 μ M から10 μ M の範囲で用量依存的に神経細胞のLDH放出を抑制していることが分かる。本実験によりドネペジルはNMDA興奮性毒性に対して濃度依存的に神経細胞保護効果を示すことが明らかとなった。

【0019】

(興奮性毒性試験)

カイニン酸は、アルツハイマー病の原因因子の一つとされている β -アミロイドが誘発する神経細胞死を増強するといわれている。本試験では、カイニン酸をラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して与えることによって細胞傷害を誘発す

るというモデルを用いた。

【0020】

本試験においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生17-19日齢）の脳皮質より得た。細胞は37°C、5%CO₂環境下で培養した。7日以上培養した後、培地にNMDAまたはカイニン酸を加え、37°C、5%CO₂環境下で一晩培養した。ドネペジルは、カイニン酸刺激を加える24時間前から細胞に添加した。そしてカイニン酸添加24時間後に培養液中に存在するLDHの量を測定し神経保護作用の指標とした。

【0021】

本試験の結果を図6に示す。図6より、ドネペジルが0.1μMから1μMの範囲で用量依存的に神経細胞のLDH放出を抑制していることが分かる。本実験によりドネペジルはカイニン酸興奮性毒性に対して濃度依存的に保護効果を示すことが明らかとなった。

【0022】

【発明の効果】

本願発明に係る神経細胞保護剤は、虚血様細胞傷害および興奮性毒性による傷害に対して神経細胞保護的に働く。よって、本願発明に係る神経細胞保護剤によって脳梗塞や脳血栓等により誘発される虚血性神経細胞死および興奮性毒性により誘発される神経細胞死を防止、抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 OGD処理の12時間前、1時間前及びOGD処理の1時間後にドネペジルを細胞に添加した場合におけるラット初代培養細胞のLDHの放出を表わすグラフである。

【図2】 OGD処理の前後におけるラット初代培養細胞の形態学的観察を示したものであり、それぞれAはコントロール、BはOGD処理を施したもの、Cはドネペジルを12時間前から添加した後にOGD処理を行なったものの状態を表わす顕微鏡写真である。

【図3】 OGD処理12時間前から種々のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加した場合とドネペジルとを添加した場合におけるラット初代培養細胞の

LDHの放出を表わすグラフである。

【図4】 OGD処理12時間前からドネペジルとともにスコポラミン (Sco) 又はメカミラミン (Mec) を添加した場合におけるラット初代培養細胞のLDHの放出を表わすグラフである。

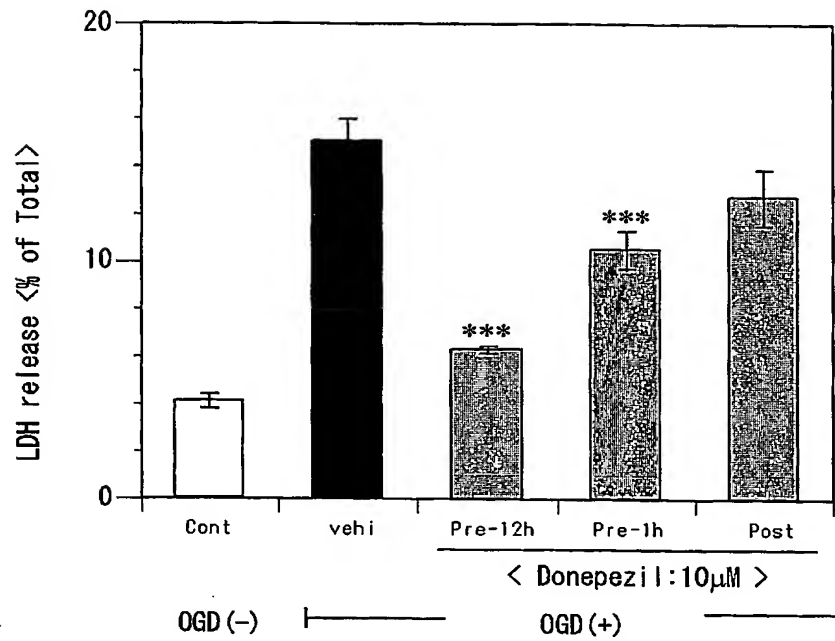
【図5】 NMDA処理によるラット初代培養神経細胞のLDHの放出に対するドネペジルの効果を表わすグラフである。ドネペジルは12時間前から加えた。

【図6】 カイニン酸処理によるラット初代培養神経細胞のLDHの放出に対するドネペジルの効果を表わすグラフである。ドネペジルは24時間前から加えた。

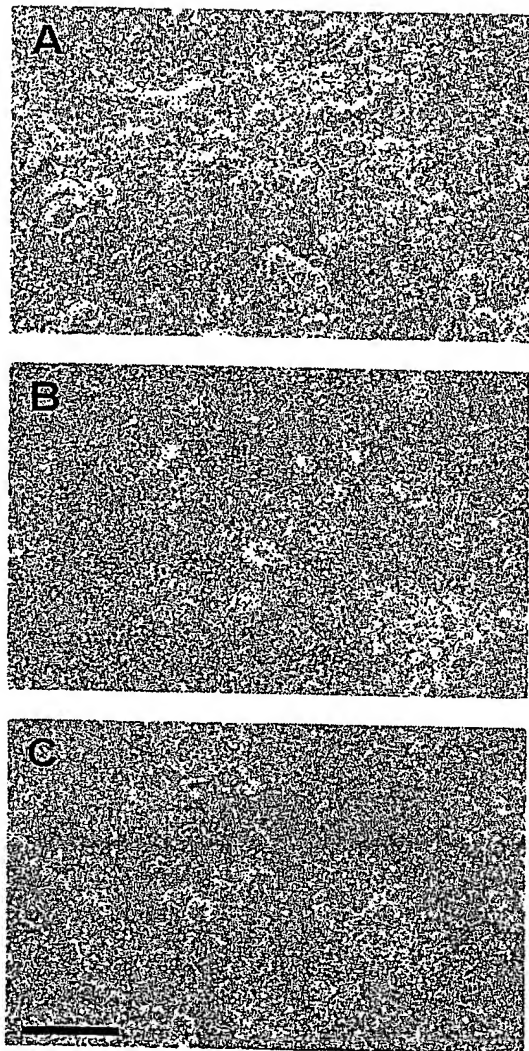
【書類名】

図面

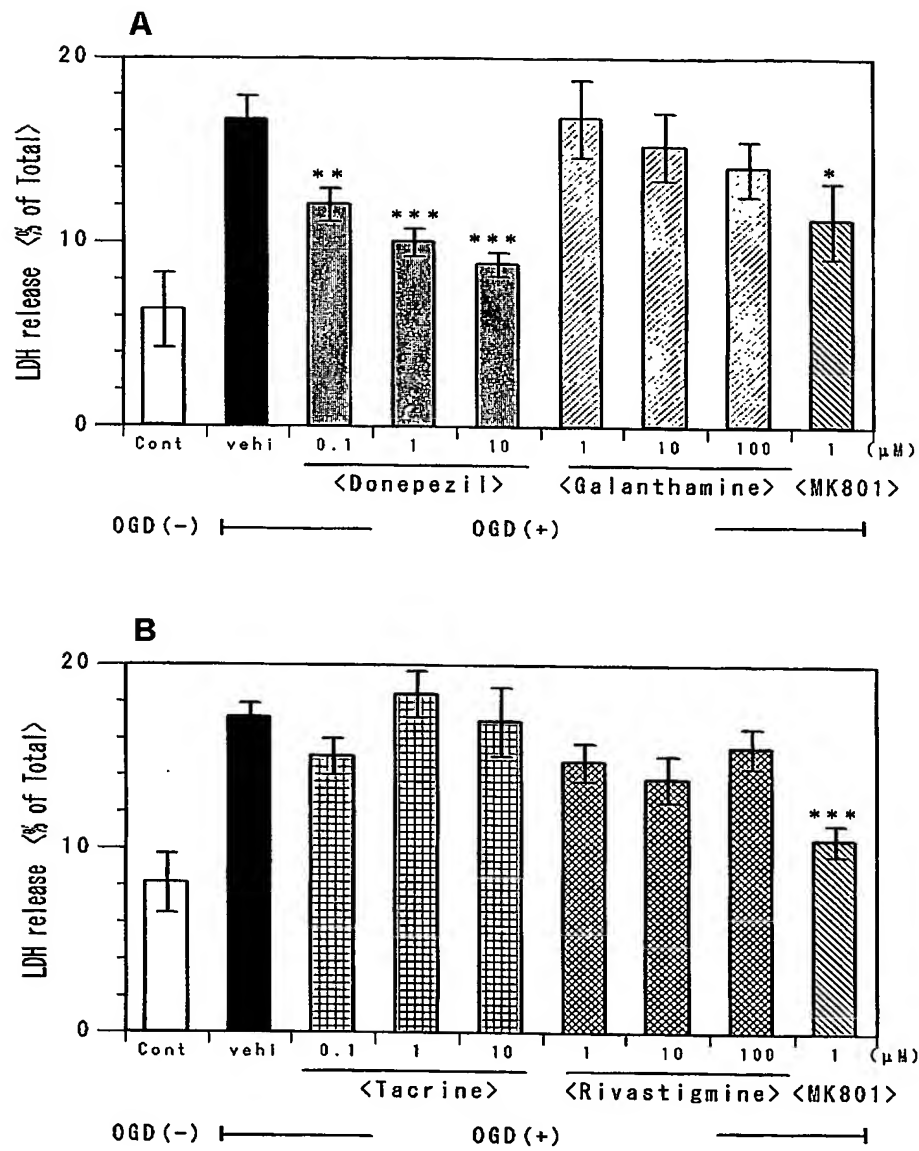
【図 1】



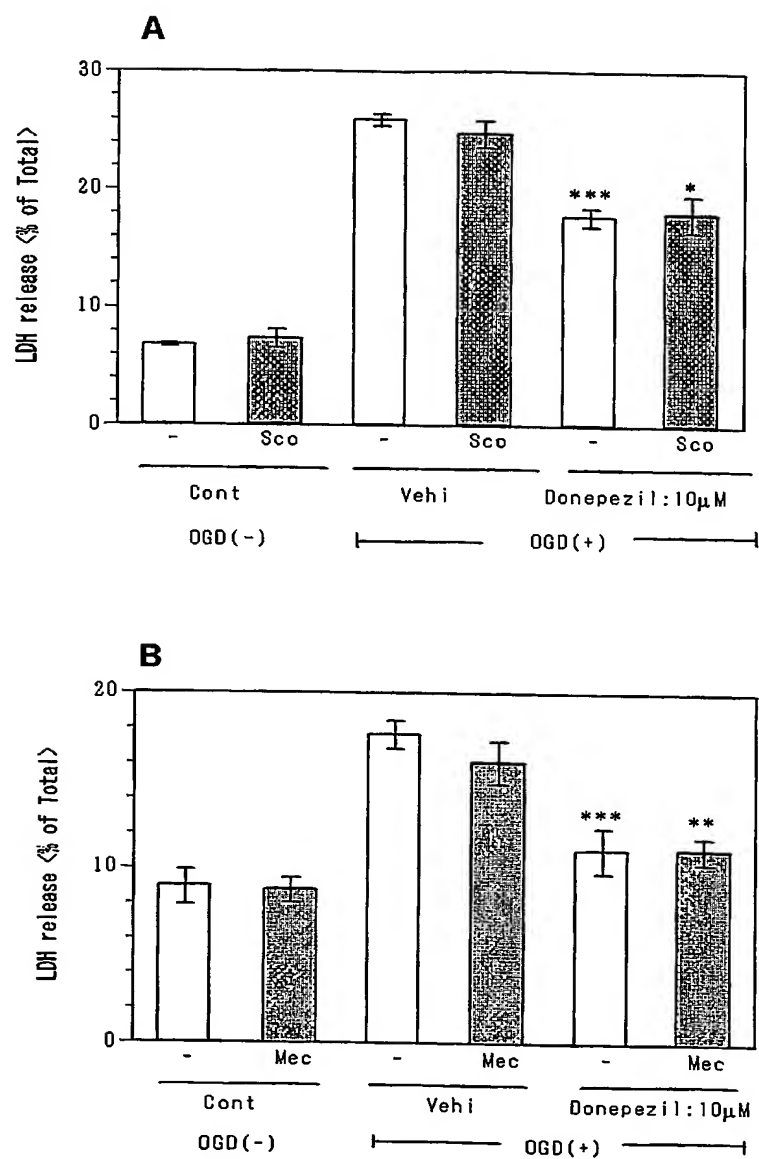
【図 2】



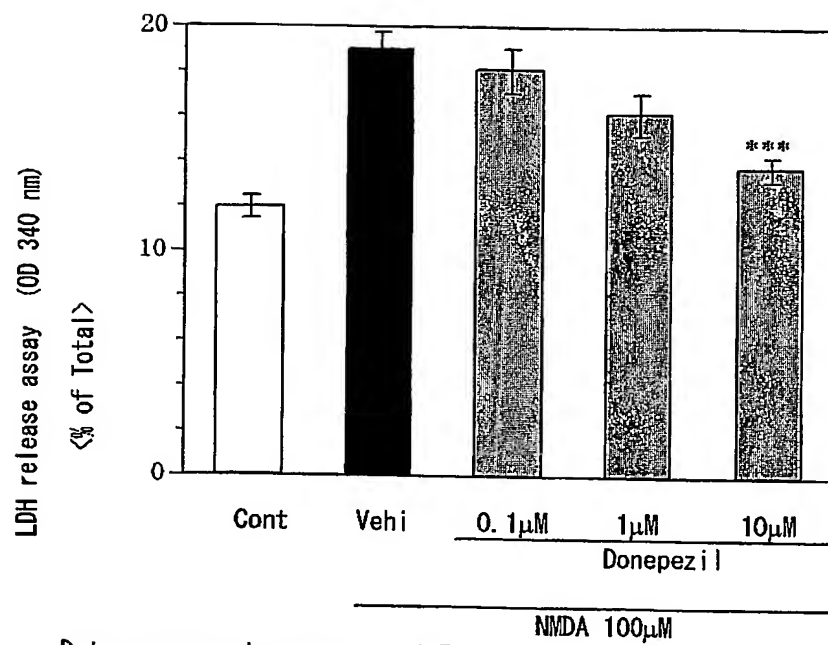
【図 3】



【図4】



【図 5】



Data expressed as mean \pm S.E.

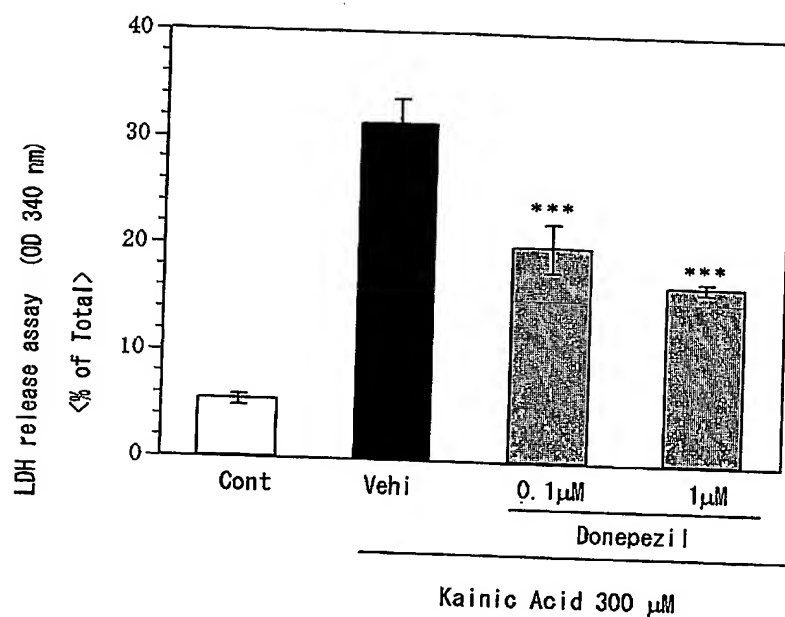
Compared with Cont. group

*P < 0.05

**P < 0.01

***P < 0.005

【図 6】



Data expressed as mean \pm S.E.

Compared with Cont. group

*P < 0.05

**P < 0.01

***P < 0.005

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 塩酸ドネペジルが、実際の神経細胞における虚血様傷害に対する保護効果を証明するデータは未だに知られていなかった。

【解決手段】 (1) 塩酸ドネペジルを含有する神経細胞保護剤、(2) 塩酸ドネペジルを含有する、脳虚血によって誘発される神経細胞傷害の予防・治療剤、(3) 塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴う脳虚血によって誘発される神経細胞傷害の予防・治療剤及び(4) 塩酸ドネペジルを含有する、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善剤を提供する。

【選択図】 なし

特願 2003-167744

ページ: 2/E

出証特 2004-3061065

特願 2003-167744

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

1990年 8月29日

新規登録

東京都文京区小石川4丁目6番10号
エーザイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.